构建融合蛋白提高重组葡萄糖异构酶的催化性能

邓辉[1,2,3]，王广林[1,2]，陈乃东[1,3]，韦传宝[1,3]

（1.皖西学院生物与制药工程学院，安徽六安 237012）（2.中科院云计算中心公共安全研究院，广东东莞 523808）

（3.六安市蛋白质分离与纯化研究中心，安徽六安 2370123）

摘要：为研究Ⅱ型Xylose/Glucose的N端蛋白序列对Ⅰ型Xylose/Glucose的作用，实验将源自超嗜热菌*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*的Ⅱ型葡萄糖异构酶（TTGIase）N端31个氨基酸序列融合到嗜热菌*Thermobifida fusca*的Ⅰ型葡萄糖异构酶（TFGIase）的N端，构建了融合蛋白N-TFGIase。实验结果显示：在相同培养和诱导条件下，N-TFGIase，菌体单位浓度产酶量比TFGIase高出约40%，比酶活比TFGIase高出26%，最适温度比TFGIase高出5 ℃，75 ℃下的半衰期较TFGIase延长30%，最适pH较TFGIase降低1.0。序列分析表明：TTGIase N端序列的mRNA二级结构不形成有阻碍的颈环结构，提高了融合蛋白的表达效率；其含有的31个氨基酸残基的疏水性指数均小于0，利于融合蛋白的初始折叠和包装；其含有的酸性氨基酸残基比例约为碱性氨基酸残基比例的两倍，减小了酸性介质环境对融合蛋白分子表面的影响。

关键词：融合蛋白；超嗜热菌；Ⅱ型木糖/葡萄糖异构酶N端序列；催化性能；序列分析

文章篇号：1673-9078(2016)10-52-59 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.009

Construction of a Fusion Protein to Improve the Catalytic Performance of Recombinant Glucose Isomerase

DENG Hui[1,2,3], WANG Guang-lin[1,2], CHEN Nai-dong[1,3], WEI Chuan-bao[1,3]

(1.College of Biology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liu'an 237012, China)

(2.Institute of Public Safety, Cloud Computing Center Chinese Academy of Sciences, Dongguan 523808, China)

(3.Lu'an Research Center of Protein Separation and Purification, Lu'an 2370123, China)

Abstract: To study the effect of the N-terminal protein sequence of type II xylose/glucose on type I xylose/glucose, the N-terminal 31 amino acid sequence of type II glucose isomerase (GIase) from the hyperthermophilic bacterium, Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus (TTGIase) was fused to the N-terminus of the type I glucose isomerase from Thermobifida fusca (TFGIase), to construct the fusion protein N-TFGIase. The experimental results showed that under the same culture and induction conditions, total yield of N-TFGIase produced by the bacteria was approximately 40% higher than that of TFGIase. The specific enzyme activity of N-TFGIase was 26% higher than that of TFGIase and the optimum temperature of N-TFGIase was 5 ℃ higher than that of TFGIase. The half-life of N-TFGIase at 75 ℃ was extended by 30% compared to that of TFGIase, and the optimum pH of N-TFGIase was reduced by 1.0 compared to that of TFGIase. Sequence analysis showed that the mRNA secondary structure of the N-terminal sequence of TTGIase did not form a blocked cervical-loop structure, thereby improving the efficiency of expression of the fusion protein. The hydrophobicity indices of 31 amino acid residues of the N-terminal sequence were all less than zero, favoring the initial folding and packaging of the fusion protein. The proportion of acidic amino acid residues was approximately twice that of the basic amino acid residues of the N-terminal sequence, thereby reducing the impact of the acidic medium environment on the surface of the fusion protein molecules.

Key words: fusion protein; hyperthermophilic bacteria; N-terminal sequence of class II xylose/glucose isomerase; catalytic performance; sequence analysis

木糖异构酶（Xylose isomerase，XIase，EC 5.3.1.5）可以催化五碳糖 D-木糖转化为 D-木酮糖，在微生物体内的糖代谢过程中起着重要的作用；在体外亦能催化 D-葡萄糖到 D-果糖的异构化反应，所以又称为葡萄糖异构酶（Glucose isomerase，GIase）。葡萄糖异构酶具有极其重要的工业应用价值，和蛋白酶、淀粉酶

收稿日期：2015-11-04

基金项目：国家 863 计划项目(2012AA021500)；国家自然科学基金项目（81274021）；国家自然科学基金项目（H2801）；皖西学院科研基金项目（WXZR201616）

作者简介：邓辉，男，博士，研究方向：蛋白质和酶工程

通讯作者：韦传宝，男，博士，教授，研究方向：蛋白质工程

等合称为重要的工业用酶[1]，引起研究人员的关注并对其开展了较为广泛的研究。在基础研究方面，发现该酶的结构非常稳定，是研究蛋白质结构与功能关系的优良模型之一[2]。

根据氨基酸序列同源性，GIase 可分为两大类[1](图 1)，Ⅰ型 GIase(约 390 个残基)主要来自于链霉菌属 *Streptomyces* sp.、密苏里游动放线菌 *A. missouriensis*、小瓶菌属 *Ampullariella* sp.、节杆菌属 *Arthrobacter* sp.和栖热菌属 *Thermus* sp.等菌种，属间序列同源性超过 50%。Ⅱ型 GIase（约 440 残基）主要来自大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 和栖热袍菌属 *Thermotoga* sp.等，属间序列同源性不超过 30%。两者相比，最明显特征在于Ⅱ型 GIase 的 N 端比Ⅰ型 GIase 的 N 端多出一个延长的区域，约 50 个氨基酸残基，在空间结构上表现为一段无规则卷曲。而关于这段序列的功能和作用尚无相关研究报道。

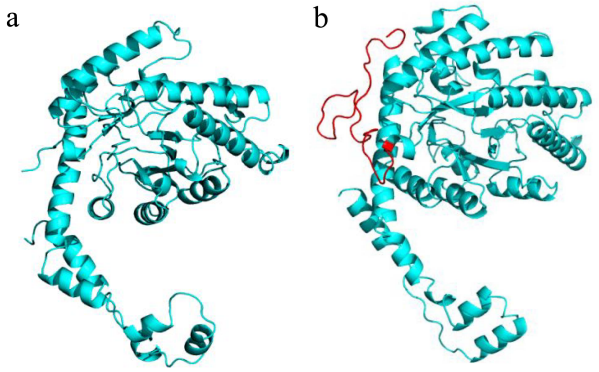


图1 两种类型GIase亚基的空间结构

Fig.1 Spatial structure of the subunits of type II GIase

注：a为Ⅰ型GIase (1BXB_A)，b为Ⅱ型GIase (1A0C_A) 括号内编号为晶体结构代码，Ⅱ型GIase的N端序列标为红色。

在本实验室前期工作中，一种来源于嗜热放线菌 *Thermobifida fusca* 的葡萄糖异构酶基因 TF*xylA* 在 *E. coli* 中成功克隆，该 TFGIase 为Ⅱ型 GIase。实验对其进行了酶学性质和转化率的分析，该酶天然状态为四聚体结构，分子量为 168 ku。以葡萄糖为底物该酶在 70 ℃、pH 7.5 条件下，K_m 和 K_{cat} 值分别为 190 mmol/L 和 35 s^{-1}，能将浓度为 45%的葡萄糖溶液中 53%的葡萄糖转化果糖，高的催化活力、高的转化率将使该酶成为改进葡萄糖异构化食品工业过程中潜力巨大的候选者[3]。

为了提升 TFGIase 的生产性能，本文从 ClassⅡ GIase N 端序列的作用和功能的研究角度出发，比对了 8 种不同种属产生的Ⅱ型 GIase 的 N 端序列，并从Ⅱ型 GIase 中，选择了一种超嗜热菌 *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricu* GIase 的 N 端序列（MNKYFENVSK IKYEGPKSNN PYSFKFYNPE E）作为研究对象，把它融合到 TFGIase 的 N 端，以研究它对Ⅰ型 *Thermobifida fusca* GIase（TFGIase）的影响和作用。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和试剂

含 *T. fusca* XY GIase 基因的重组质粒 pMD18-T/TF*xylA* 和重组质粒 pET24a-TF*xylA* 为本实验室前期构建。*E.coli* JM109 菌株、*E.coli* BL21(DE3)菌株购自全式金生物技术公司；质粒 pMD18-T 和 pET24a 购买于英杰公司（Invitrogen）。DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物凝胶纯化试剂盒、Prime STARTM HS DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 连接酶购自大连宝生物公司（TakaRa）。*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* N 末端基因密码子优化及其合成、DNA 引物合成和 DNA 片段测序均由上海生工生物公司完成，用于 SDS-PAGE 的中等分子量标准蛋白购自上海杰瑞，其他化学试剂为分析纯购自国药集团。

1.2 融合蛋白表达载体的构建

以重组质粒pMD18-T/TF*xylA*为模板，利用引物对F_1和F_2，PCR扩增*T.fusca* GIase基因TF*xylA*，PCR反应体系为：98 ℃解链10 s，68 ℃退火1.2 min，循环30次，PCR产物经过凝胶纯化备用。以合成的核酸片段N-N’（TT*xylA* N端93 bp与TF*xylA* N端15 bp的连接片段，基因片段被插入到克隆载体pUC57上，核苷酸序列经过密码子优化，优化物种为*E.coli*）为模版，利用引物对F_3和F_4扩增基因核酸片段N-N’，PCR反应体系为：98 ℃解链10 s，68 ℃退火7 s，循环30次，PCR产物经过凝胶纯化备用；再以基因TF*xylA*和核酸片段N-N’为模版，进行第一步PCR反应，反应体系为：98 ℃解链10 s，50 ℃退火5 s，72 ℃退火80 s，循环10次，再添加引物F_3和F_2，进行第二步PCR反应，反应体系为：98 ℃解链10 s，68 ℃退火80 s，循环30次，得到融合基因N-TF*xylA*，PCR产物经过凝胶纯化后备用。纯化后的PCR产物经末端加“A”后与载体pMD18-T连接，再转入*E.coli*.JM109 进行扩增，构建重组质粒pMD18-T/N-TF*xylA*，经酶切和基因测序验证正确后，用限制性内切酶*Nde* I和*Hin*d III将目的基因剪切回收与同样处理的载体pET24a 连接后，再转化到*E.coli*.JM109 进行扩增，构建重组质粒pET24a/N-TF*xylA*。

表1 构建融合基因N-TF*xylA*及其表达载体所用的引物及序列

Table 1 Primers and sequences for the construction of N-TFxylA and its expression vectors

序列名称	序列组成
F_1-*Nde* Ⅰ:	5’ CATATGAGCAACTACCAGCCCACACCCGAG 3’
F_2-*Hind* Ⅲ:	5’ AAGCTTTTAGCGCACGCCCAGGAGGTAGT 3’
F_3-*Nde* Ⅰ:	5' CATATGAACAAATACTTCGAAAATGTTAGCAAA 3'
F_4:	5' TGTGGGCTGGTAGTTGCTCATTTCTTCAGG 3'
TTGIase N端氨基酸序列（31aa）	5’ MNKYFENVSK IKYEGPKSNN PYSFKFYNPE E 3’
TT*xylA*的N端核苷酸序列（93 bp）	5‘ ATGAATAAATATTTTGAGAACGTATCTAAAATAAAATATGAAGGACCAAAATC AAACAATCCTTATTCTTTTAAATTTTACAATCCTGAGGAA 3’
密码子优化后的TT*xylA*的N端核苷酸序列（93 bp）	5’ ATGAACAAATACTTCGAAAATGTTAGCAAAATCAAATATGAGGGTCCA AAGTCCAACAACCCGTACTCTTTCAAATTTTACAACCCTGAAGAA 3’
合成的基因片段N-N’（108 bp）	5’ ATGAACAAATACTTCGAAAATGTTAGCAAAATCAAATATG AGGGTCCAAAGTCCAACAACCCGTACTCTTTCAAATT TTACAACCCTGAAGAAATGAGCAACTACCAGCCCACA 3’

注：划线部分为限制性酶切位点。

1.3 融合蛋白的诱导表达

将重组质粒pET24a/TF*xylA*和pET24a/N-TF*xylA*转化表达宿主*E.coli*.BL21 (DE3)，在LB/Amp平板筛选出转化子。验证正确的转化子接入10 mL LB/Amp培养基中，37 ℃生长8 h，然后接种到100 mL TB/Amp培养基中，37 ℃培养直到菌浓OD_{600}达到1.5，添加IPTG至终浓度为0.1 mM，并降温到25 ℃，继续培养25 h。4 ℃离心收集菌体，超声破碎后分别收取上清和沉淀进行12% SDS-PAGE电泳检验，同时以重组菌BL21(DE3)/pET24a的菌体蛋白作为对照，以确定融合蛋白的表达效果。

1.4 rGIase 的分离纯化

除非另作说明，所有过程均在有氧和 4 ℃条件下进行。

第一步：胞内酶提取。10000 r/min，离心 10 min，将菌体细胞从发酵液中分离，然后用 1/5 体积含有 5 mM $MgSO_4$、1 mM $CoSO_4$ 的磷酸缓冲液（pH 7.5）悬浮，悬浮液经超声破壁后，13000 r/min 离心 15 min，上清即为 5×粗酶液。

第二步：热处理。5×粗酶液在 75 ℃热处理 10 min 后 13000 r/min 离心 15 min，收集上清 4 ℃保存备用。

第三步：色谱柱层析。上述酶液经 0.22 μm 的滤膜过滤后，注入预先用 30 mM Na_2HPO_4-KH_2PO_4 buffer A(包含 5 mM $MgSO_4$，pH 7.5)平衡的 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱中。在 ÄKTATMPurifier 蛋白纯化系统上，用 10 倍柱体积的 Tris-HCl buffer A 线性洗脱色谱柱中的蛋白，依据系统中 UV 280 检测蛋白洗脱曲线，把具有活性的吸收峰蛋白溶液收集后注入 Superose G200 凝胶排阻色谱柱，具有活性的同一吸收峰的蛋白溶液被收集，超滤装置浓缩后保存在-80 ℃。

1.5 重组 GIase 的活性测定

重组 GIase（rGIase）的活性测定其异构转化葡萄糖为果糖的活性。反应体系为 1 mL，包含 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.5），900 mmol/L D-葡萄糖，5 mmol/L $MgSO_4$，1 mmol/L $CoSO_4$，0.1 mL 适当稀释的酶液。反应体系在 70 ℃水浴反应 10 min，然后用 1 mL 0.5 mol/L $HClO_4$ 溶液中止。反应体系中的 D-果糖通过半胱氨酸-咔唑方法测定[4]。1 个酶活力单位（U）定义为上述反应条件下，1 min 内生成的 1 μmol D-果糖。实验设置三个重复。除非特别说明，以下实验酶活测定均按此方法进行。蛋白质浓度通过 Bradford 方法[5]测定，以小牛血清（BSA）建立标准曲线。

1.6 温度对重组 GIase 的影响

通过测定 rGIase 在 40~95 ℃的酶活确定 rGIase 的最适温度。反应体系中的 rGIase 溶液和其它溶液分别在设定温度预热 1 min 后，再混合启动反应，并使转化反应过程持续 10 min；将 rGIase 溶液分别在 75 ℃条件下温浴，间隔一定时间取样，通过测定样液的残留酶活，绘制酶在不同时间下的残留酶活曲线，确定其在 75 ℃条件下的半衰期。缓冲液在 75 ℃下调整到 pH 7.5，实验设置三个重复。

1.7 pH 对重组 GIase 的影响

通过测定 rGIase 在 pH 4.0~11.0 范围内的酶活确定 rGIase 的最适 pH 在不同 pH 范围分别使用 NaAc-HAc 缓冲液（pH 4.0~5.0）、Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液（pH 5.0~9.0）和 Gly-NaOH 缓冲液（pH 9.0~12.00 进行转化反应，缓冲液在 70 ℃下调整到设定 pH 值。pH 稳定性也在 pH 4.0~11.0 范围内测定，把酶液添加到不同 pH 值的缓冲液中，4 ℃放置 48 h 后，在 pH 7.5 条件下测定残留酶活。实验设置三个重复。

1.8 动力学参数

rGIase 催化动力学分析采用葡萄糖(20~600 mM)为底物使用连续分光光度法分析。初始反应速率通过改变底物浓度计算初始反应过程(1 min)的直线斜率而得。动力学常数 K_m 和 V_{max} 由初始反应速率与底物浓度的双倒数曲线(1/v:1/[*S*])计算而得。催化速率常数 $K_{cat}=V_{max}/[E]$，[*E*]为酶的浓度。直线回归采用 Kaleida Graph 软件分析[6]。实验设置三个重复。

1.9 高果糖浆的生产和 HPLC 分析

rGIase 的转化能力以浓度为 45%葡萄糖溶液中葡萄糖异构化为果糖的量确定。考察 pH 7.5 条件下重组葡萄糖异构酶的转化能力，葡萄糖转化体系为 5 mL，包含 50 mM Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH 7.5)，45%（*m/V*）D-葡萄糖，5 mM $MgSO_4$，1 mM $CoSO_4$，25 U/g 葡萄糖的加酶量，70 ℃水浴，间隔一定时间取样，样品于沸水中加热 5 min 使样品中的酶失活变性后，稀释为 1/100，12000 r/min，离心 25 min，上清经 0.45 μm 超滤膜过滤后进行分析 HPLC 分析的条件为：Agilent1200 HPLC 色谱仪，Agilent 自动进样器，色谱柱 Aminex HPX-87H lon Exclusion Cloumn (7.8 mm× 300 mm)，Agilent 1200 示差检测器；流动相为 0.001 M H_2SO_4 溶液，流速 0.6 mL/min；柱温 50 ℃；池温(检测器)30 ℃；进样量 10 μL。实验设置三个重复。

2 结果和讨论

2.1 融合蛋白 N 端序列的选择

GIase 按照氨基酸序列同源性，可分成两大类型：I 型“短”GIase 的氨基酸序列长约 390 bp，类型 II“长”GIase 的氨基酸序列长约 440 bp。II 型与 I 型相比，最明显特征在于 II 型 GIase 的 N 端比 I 型 GIase 的 N 端多出一个延长的区域，在空间结构上表现为一段无规则卷曲。而关于这段序列的作用未知。本文比对了 8 种不同种属产生的 II 型 GIase 的 N 端序列，选取长度约 40 氨基酸，截取到保守位点 H41（基于 TTGIase）前。氨基酸序列比对结果表明不同种属产生的 GIase 的 N 端序列的同源性差异较大，源于嗜热菌的 II 型 GIase 的 N 端序列与源于常温菌的 II 型 GIase 的 N 端序列的同源性在 35%~54%之间。

为达到改善 GIase 生产性能的目的，我们从超嗜热菌来源的 II 型 GIase 中，选择了超嗜热耐酸菌 TTGIase 的 N 端部分序列（MNKYFENVSK IKYEGPKSNN PYSFKFYNPE E）作为研究对象，把它融合到 TFGIase 的 N 端，以进一步研究其对 I 型 GIase 的功能和作用。

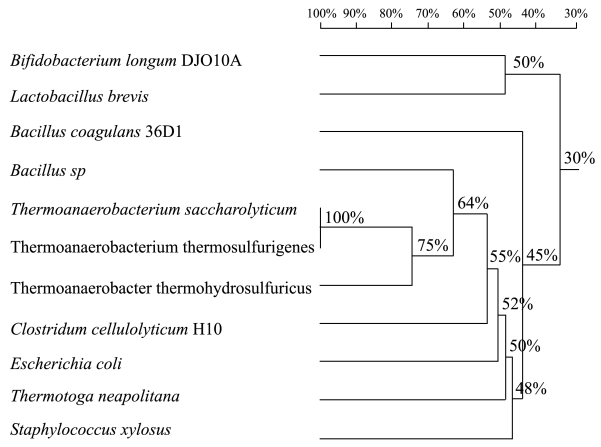


图 2 II 型 GIase N 端序列同源性关系

Fig.2 Homologous relationships among N-terminal sequences of type II GIases

2.2 N-TFGIase 的的构建、表达和纯化

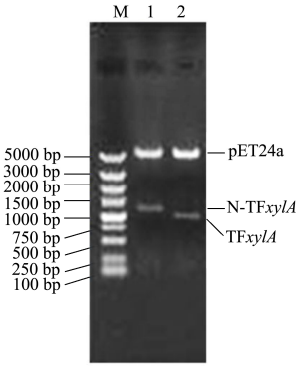


图 3 重组质粒的酶切验证

Fig.3 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid

注: 泳道 M 为 Marker; 泳道 1，2 分别为 pET24a/N-TF*xylA* 和质粒 pET24a/TF*xylA* 的双酶（*Nde* I 和 *Hin*d III）切产物。

以质粒 pET24a/TF*xylA* 为模板，利用设计的引物 F_1 和 F_2 PCR 扩增 TFGIase 基因 TF*xylA*，以合成的基因片段 N-N’为模版，利用设计的引物 F_3 和 F_4 PCR 扩增基因片段 N-N’，再以基因 TF*xylA* 和基因片段 N-N’为模版，利用引物 F_2 和 F_3，采用重叠 PCR 技术，扩

增融合基因 N-TF*xylA*。与扩增载体 pMD18-T 相连接，构建的重组质粒 pMD18-T/N-TF*xylA* 经酶切验证和测序结果正确后，再将融合基因 N-TF*xylA* 与表达载体 pET24a 相连接，构建得到重组质粒 pET24a/N-TF*xylA*，酶切验证结果见图 3，将重组质粒转入宿主菌 *E.coli* BL21(DE3)，构建出重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/ pET24a/N-TF*xylA*。

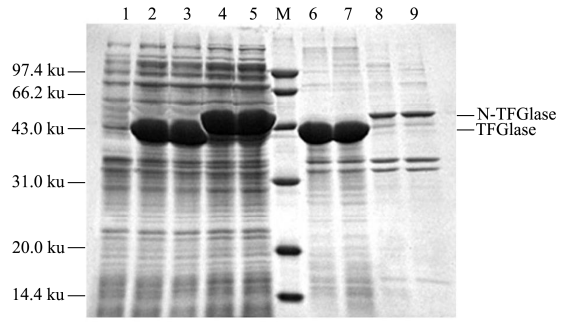


图 4 SDS-PAGE 电泳分析 rGlase 诱导表达效果

Fig.4 Analysis of rGIase inducible expression by SDS-PAGE

注：泳道 M 标准蛋白；泳道 1 空载菌对照；泳道 2,3 含 GIase 菌的破壁上清；泳道 4,5 含 N-GIase 菌的破壁上清；泳道 6,7 含 GIase 菌的破壁沉淀；泳道 8,9 含 N-GIase 菌的破壁沉淀。

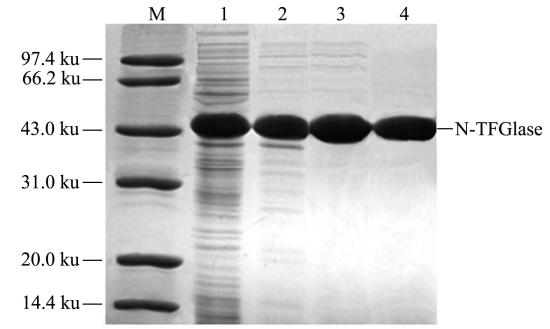


图 5 N-TFGlase 不同纯化阶段产物的 SDS-PAGE 蛋白电泳

Fig.5 SDS-PAGE of N-GIase products from different purification steps

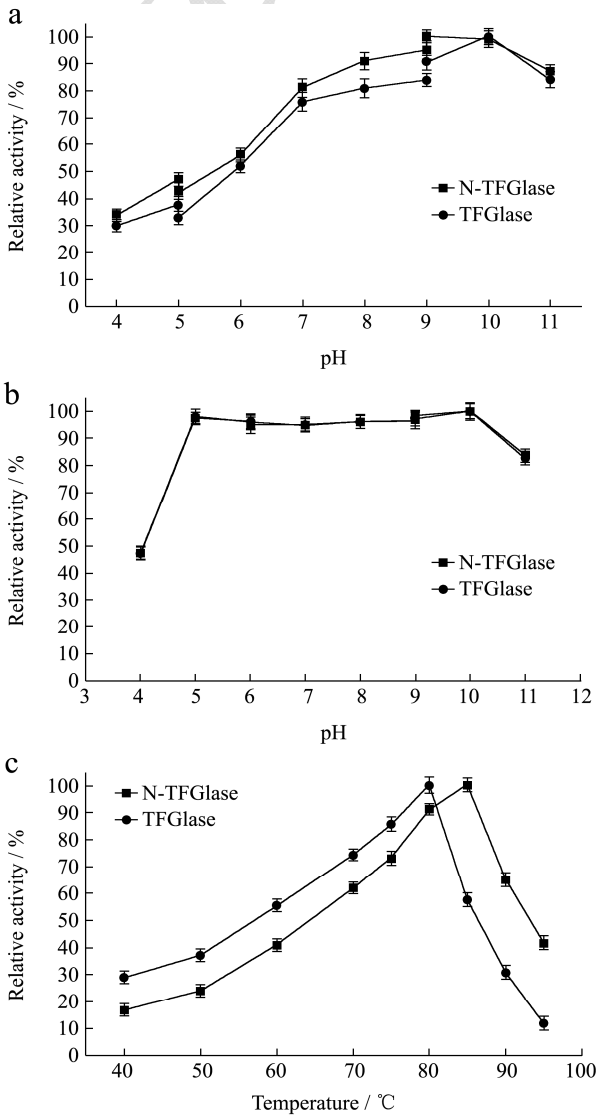
注：M，标准分子量；1，破壁上清；2，热处理纯化酶；3，离子柱纯化酶；4，凝胶柱纯化酶。

将构建成功的 pET24a/N-TF*xylA* 和 pET24a /TF*xylA* 载体分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，在相同温度 25 ℃下用相同浓度的 IPTG 诱导表达，将诱导表达后的菌体进行超声破碎，高速离心获得可溶性上清和不溶性沉淀，分别对上清和沉淀（用等体积磷酸缓冲液悬浮）进行 12%SDS-PAGE 检测。结果表明，与 pET24a 空载体相比，转化了重组质粒 pET24a/N-TF*xylA* 和 pET24a/TF*xylA* 的菌体分别在相对分子量为 45 ku 和 42 ku 处获得明显的表达蛋白条带，与预期大小相符；融合蛋白在 BL21(DE3)中同时以不溶性蛋白(包涵体或聚集体)和可溶性蛋白两种形式表达(图 2，第 2~9 泳道)，令人惊奇的是 N-TFGIase 在诱导表达过程中仅产生少量不溶性目的蛋白，而 TFGIase 在诱导表达过程中产生了几乎等量的可溶性蛋白和不溶性蛋白。而两者的产酶量（酶活力）检测也证实了这一点，即胞内酶活分别为 33 U/mL 和 52 U/mL。

通过超声破碎、热处理、离子交换色谱和凝胶排阻色谱对 rGIase 进行分离纯化（图 5）。最终得到的电泳纯 N-TFGIase 的比酶活 48 U/mg，比电泳纯 TFGIase 的比酶活 40 U/mg 高出 20%，为目前已知工业生产用菌株所产 GIase 的最高比酶活[7~13]。

2.3 重组酶的酶学性质比较

为了研究Ⅱ型 Xylose/Glucose 的 N 端蛋白序列的对 I 型 Xylose/Glucose 的具体影响和作用，实验对融合酶 N-TFGIase 和天然酶 TFGIase 的理化性质、动力学常数和转化能力进行了考察。



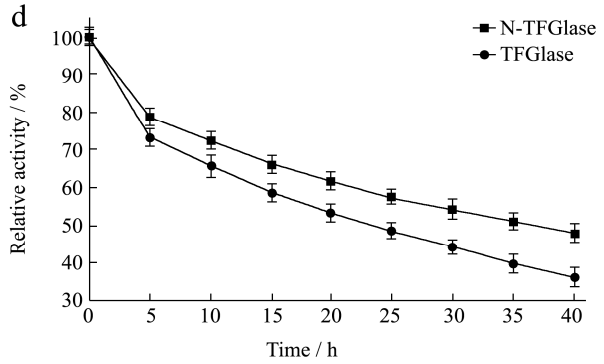


图 6 pH 和温度对重组酶活力和稳定性的影响

Fig.6 Effects of pH and temperature on the activity and stability of rGIase

注：a，最适 pH；b，pH 稳定性；c，最适温度；d，热稳定性；pH 4~5 为醋酸缓冲液；pH 5~9 为磷酸缓冲液；pH 9~11 为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

2.3.1 pH 对 N-TFGIase 的影响

在 pH 4.0~11.0 范围内研究 rGIase 最适 pH 和酸碱稳定性。实验结果表明 N-TFGIase 和 TFGIase 的酸碱稳定性相似，在 pH 5.0~10.0 范围相对酶活基本稳定，而 N-TFGIase 的最适 pH 相对 TFGIase，由 pH 10 降低至 Ph 9，最适 pH 的降低使其在原生产条件下的酶活力更高。同时，与 TFGIase 相比，N-TFGIase 在 pH 4~7 的范围内，相对酶活都高于 TFGIase，说明 N-TFGIase 的对酸环境的耐受性也高于 TFGIase，因为低 pH 条件下反应可以减少异构过程中副产物的形成[14]，所以融合酶 N-TFGIase 更符合生产需要。

2.3.2 温度对 N-TFGIase 的影响

在 pH 7.5 条件下，测定不同温度下 rGIase 最适温度，研究温度对酶活力的影响。实验结果表明，TFGIase 的最适反应温度为 80 ℃，而 N-TFGIase 的最适反应温度为 85 ℃，85 ℃以上，N-TFGIase 的相对酶活性高于 TFGIase，因此 N-TFGIase 对高温的耐受性也高于 TFGIase。在 75 ℃条件孵育 rGIase，测定不同时间下 rGIase 的酶活力，研究 rGIase 的热稳定性。在 75 ℃，N-TFGIase 的半衰期约 38 h，相对与 TFGIase 的半衰期约 24 h 延长了 30%，即融合酶 N-TFGIase 的热稳定性更高。

2.3.3 动力学常数

以葡萄糖为底物对纯化后的 rGIase 进行动力学分析，通过初始转化速度和底物浓度的双倒数曲线计算，在 pH 7.5 和 70 ℃条件下，N-TFGIase 的 K_m 为 190 mM，与 TFGIase 的 K_m 相同，N-TFGIase 的 K_{cat} 值为 44 s^{-1}，比 TFGIase 的 K_{cat} 值 36 s^{-1} 高出 25%，据我们所知，这是已报道的在相似条件下催化效率最高的 GIase[15]。

2.3.4 异构葡萄糖为果糖的转化率

在 Ph 7.5 和 70 ℃条件下，以 25 U/g 葡萄糖的加酶量将 TFGIase 或 N-TFGIase 添加到 45%（*m/V*）的葡萄糖溶液中进行异构转化反应，用 HPLC 检测反应过程中果糖含量的变化。反应初始时果糖含量迅速升高，都在 4 h 左右达到平衡，最终果葡糖浆中果糖的含量占总糖含量的比例约为 53% (*m/m*)，这是已知生产用酶达到的最高转化率[15]。

2.4 N-TFGIase 的表达效果和生产性能改善的分子基础

高效过量表达目的蛋白是酶制剂生产企业的不懈追求，表达效果与多种因素相关，既与生产菌株的外在的温度、pH、离子强度和营养条件相关，也与基因本身的序列结构特点、载体类型和表达宿主有关。原核表达系统尤其是大肠杆菌表达系统是目前掌握的最为成熟的表达系统。大肠杆菌的遗传背景清楚，又具有周期短、高效率、易操作、使用安全等特点，成为外源基因的首选表达系统。pET系统是有史以来在*E.coli*中表达重组蛋白功能最强大的载体系统。其包含的T7 RNA聚合酶机制十分有效并具选择性：在充分诱导时，几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白，目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的50%以上。T7启动子以及多种拥有不同抑制本底表达水平的宿主细胞共同构成了一个极为灵活而有效的系统，使各种目的蛋白得以最优化表达。本实验选择*E.coli* BL21（DE3）为表达宿主，pET24a(+)为表达载体，表达目的蛋白 rGIase。就目的蛋白的基因本身而言，影响其在大肠杆菌表达系统中表达的因素主要有mRNA的稳定性、翻译起始效率以及序列的组成和结构。包涵体是外源基因在宿主中高效表达时形成的一种不溶、无活性的蛋白聚集体[16]，这是实践过程中一个十分棘手的问题。包涵体形成的原因可能与合成速度、表达量直接相关，原因是合成速度太快或表达蛋白过高使得细胞没有足够的时间和空间对蛋白进行正确有效的折叠，导致蛋白间的非特异性结合，使蛋白的溶解度降低而析出。本文试从N-TFGIase基因的mRNA的结构和N-TFGIase的氨基酸序列的组成和分子结构分析N-TFGIase的表达效果和生产性能改善的分子基础。

2.4.1 mRNA 二级结构对表达效果的影响

Nivinskas R[17]对核糖体结合部位的二级结构对转录效率的影响作了较系统的定量研究，得出在AUG前后(从-30~+30的基因片段)一级结构的稳定性和相对表达水平明显相关，mRNA越不稳定，即自由能越高，

越利于外源基因的表达。由于表达载体中起始密码子之前的序列都相同，因此，我们依据mRNA空间构象预测软件RNAstructure仅对起始密码子后30位序列形成的mRNA空间构象及自由能进行分析，TFGIase基因xylA的起始密码子后30位序列(AUGAGCAACUACCAGCCCACACCCGAGGACCGG)形成的mRNA空间构象由图7所示，翻译起始位点AUG处于发卡结构内，其在其后的序列形成5处配对键，且都为稳定GC配对键，该段序列的自由能为-3.1，而TTGIase基因xylA的起始密码子后30位碱基序列(AUGAACAAAUACUUCGAAAAUGUUAGCAAAAUC)不形成颈环结构，自由能为0，在mRNA结构角度看，我们认为这是N-TFGIase基因的表达量比TFGIase基因的表达量更高的原因。

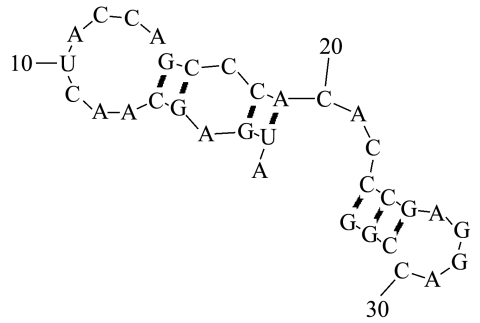


图7 TFxylA的mRNA起始密码子后30个碱基的二级结构构象

Fig.7 Secondary structure conformation of 30 bases after the TFxylA mRNA initiation codon

2.4.2 氨基酸序列的组成和分子结构对表达效果的影响

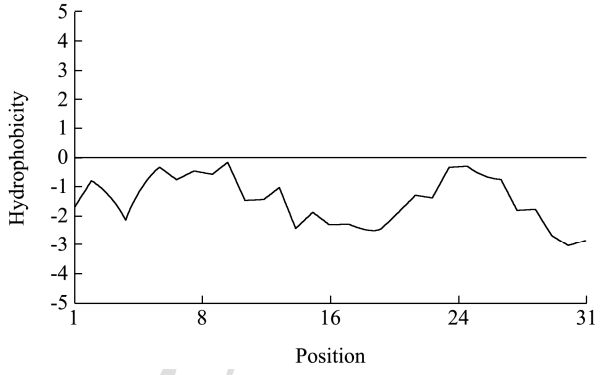


图8 融合蛋白N-TFGIase的N端31个氨基酸残基的疏水性指数

Fig.8 Hydrophobicity indices of 31 amino acid residues at the N-terminus of the fusion protein N-TFGIase

氨基酸序列组成的分析结果表明：融合蛋白N-TFGIase的N端31个氨基酸残基的疏水性指数均小于0（图8），初始序列呈现的低疏水性有效避免了新合成氨基酸序列的堆积，有利于蛋白的正确折叠和包装，大大减弱了目的蛋白在高效表达时形成不溶性包涵体的几率，这与N-TFGIase产生的包涵体比TFGIase产生的包涵体更少的实验结果相吻合（图4）。

此外，引入的31个氨基酸残基中酸性氨基酸比例约为碱性氨基酸比例的两倍，由于该段序列分布在酶分子表面，在酸性环境下，酶分子表面电荷变化小，减小了介质环境对酶分子表面的影响，可能增强了其在酸环境中的适应性能力。空间结构推定结果表明：因为TTGIase亚基的N端部分序列分布在四聚体成熟酶的表面，与其表面其他氨基酸残基形成多处极性键（图9基于TTGIase晶体结构[1AOC]，利用PyMOL 1.4软件绘制），那么我们推测融合蛋白N-TFGIase N端31个氨基酸也应该分布于成熟酶分子表面，与酶分子表面其它氨基酸残基也应形成多个极性键，这些相互作用可能增强了N-TFGIase分子结构的稳定性，减小了高温下分子的形变程度，因此有助于增强TFGIase的热稳定性，同时，这些相互作用可能也间接的影响到催化部位的氨基酸位置，从而产生了更高的转化速率。

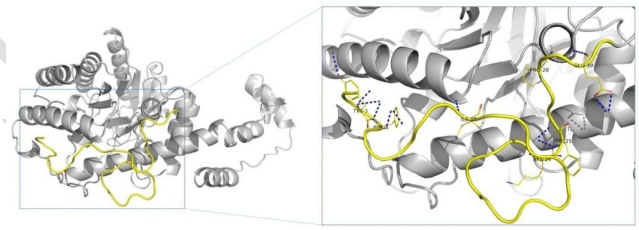


图9 TTGIase N端序列与酶分子表面形成的极性键

Fig.9 Polar bonds formed by the N-terminals of TTGIase with enzyme molecules

注：TTGIase亚基显示为条带形式，N端31个氨基酸显示为黄色，与酶表面分子成键（蓝色虚线）的氨基酸侧链特别显示为分子结构形式。

3 结论

实验尝试将来自超嗜热耐酸菌 *T. thermohydrosulfuricus* TTGIase N端的31个氨基酸序列融合到嗜热菌 *T. fusca* TFGIase的N端，构建融合蛋白N-TFGIase，并对纯化的重组融合蛋白N-TFGIase进行了过量表达和酶学性质的研究。实验结果表明：来自 *T. thermohydrosulfuricus* TTGIase N端的31个氨基酸序列融合到TFGIase N端后，有助于目的蛋白的正确折叠，减少包涵体的形成；相比TFGIase，融合蛋白N-TFGIase的热稳定性和催化速率 K_{cat} 都有不同程度的增强，而最适pH降低，这些性能的改变有助于GIase的生产性能的提升。实验工作为TFGIase的分子改造和生产应用提供了重要参考。

参考文献

[1] Bhosale S H, Rao M B, Deshpande V V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase [J]. Microbiol. Rev., 1996, 60(2): 280-300

[2] Zeikus J G, Vieille C, Savchenko A. Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships [J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 179-183

[3] Deng H, Chen S, Wu D, et al. Heterologous expression and biochemical characterization of glucose isomerase from *Thermobifida* fusca [J]. Bioprocess Biosyst. Eng., 2014, 37(6): 1211-1219

[4] Michal G, Moellering H, Gruber W. Enzymatic determination of fructose-1-phosphate [J]. Enzymol Biol. Clin. (Basel), 1968, 9(2): 154-159

[5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254

[6] Nini L, Sarda L, Comeau L C, et al. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study [J]. Biochim. Biophys. Acta, 2001, 1534(1): 34-44

[7] Hashemiravan M, Barikani A S. Biotechnological production of glucose isomerase enzyme with Streptomyces olivochromogenes for production of fructose syrup from hydrol [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 118: S144-S144

[8] Lehmacher A, Bisswanger H. Comparative kinetics of D-xylose and D-glucose isomerase activities of the D-xylose isomerase from Thermus aquaticus HB8 [J]. Biol. Chem. Hoppe Seyler, 1990, 371(6): 527-536

[9] Smith C A, Rangarajan M, Hartley B S. D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Purification and properties [J]. Biochem. J., 1991, 277(Pt 1): 255-261

[10] Van Bastelaere P B, Kersters-Hilderson H L, Lambeir A M. Wild-type and mutant D-xylose isomerase from *Actinoplanes* missouriensis: metal-ion dissociation constants, kinetic parameters of deuterated and non-deuterated substrates and solvent-isotope effects [J]. Biochem. J., 1995, 307(Pt 1): 135-142

[11] Amore R, Hollenberg C P. Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein [J]. Nucleic Acids Res., 1989, 17(18): 7515

[12] Kaneko T, Takahashi S, Saito K. Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces sp*., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2000, 64(5): 940-947

[13] Lee C Y, Zeikus J G. Purification and characterization of thermostable glucose isomerase from Clostridium thermosulfurogenes and thermoanaerobacter strain B6A [J]. Biochem. J., 1991, 273 (Pt 3): 565-571

[14] Fang H H, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture [J]. Bioresour. Technol., 2002, 82(1): 87-93

[15] Bhosale S H, Rao M B, Deshpande V V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase [J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(2): 280-300

[16] Kopito R R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation [J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(12): 524-530

[17] Nivinskas R, Malys N, Klausa V, et al. Post-transcriptional control of bacteriophage T4 gene 25 expression: mRNA secondary structure that enhances translational initiation [J]. J. Mol. Biol., 1999, 288(3): 291-304